

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Mikiko SUGA, et al.

GAU:

SERIAL NO: NEW APPLICATION

EXAMINER:

FILED: HEREWITH

FOR: ARGININE REPRESSOR DEFICIENT STRAIN OF CORYNEFORM BACTERIUM AND METHOD FOR PRODUCING L-ARGININE



REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
JAPAN	2000-129167	April 28, 2000

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ is submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
(B) Application Serial No.(s)
 - ☐ are submitted herewith
 - ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.

Norman F. Oblon

Registration No. 24,618

C. Irvin McClelland
Registration Number 21,124



22850

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 4月28日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-129167

出 願 人

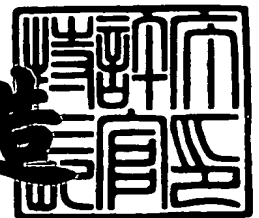
Applicant (s):

味の素株式会社

2001年 3月16日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3020682

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-7232

【提出日】 平成12年 4月28日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 13/10
C12N 15/00

【発明の名称】 コリネ型細菌のアルギニンリプレッサー欠失株及びL-アルギニンの製造法

【請求項の数】 4

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵技術研究所内

 【氏名】 菅 美喜子

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵技術研究所内

 【氏名】 朝倉 陽子

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵技術研究所内

 【氏名】 森 由起子

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵技術研究所内

 【氏名】 伊藤 久生

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵技術研究所内

 【氏名】 倉橋 修

【特許出願人】

【識別番号】 000000066

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089244

【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 0 3 - 3 6 6 9 - 6 5 7 1

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 コリネ型細菌のアルギニンリプレッサー欠失株及びＬーアルギニンの製造法

【特許請求の範囲】

【請求項１】 アルギニンリプレッサーが正常に機能せず、かつ、Ｌーアルギニン生産能を有するコリネ型細菌。

【請求項２】 前記コリネ型細菌は、染色体上のアルギニンリプレッサーをコードする遺伝子が破壊されたことにより、アルギニンリプレッサーが正常に機能しないことを特徴とする請求項１記載のコリネ型細菌。

【請求項３】 前記アルギニンリプレッサーは、配列番号１８に示すアミノ酸配列又は同アミノ酸配列と相同性を有するアミノ酸配列を有する請求項２記載のコリネ型細菌。

【請求項４】 請求項１～３のいずれか一項に記載のコリネ型細菌を培地で培養し、培地中にＬーアルギニンを生成蓄積せしめ、これを該培地から採取することを特徴とするＬーアルギニンの製造法。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】

本発明は、Ｌーアルギニン生産能を有するコリネ型細菌及び同微生物を用いたＬーアルギニンの製造法に関する。Ｌーアルギニンは、肝機能促進薬、アミノ酸輸液及び総合アミノ酸製剤等の成分として、産業上有用なアミノ酸である。

【０００２】

【従来の技術】

従来、発酵法によるＬーアルギニンの製造は、コリネ型細菌野生株；サルファ剤、２－チアゾールアラニン又は α －アミノ－ β －ヒドロキシ吉草酸等の薬剤に耐性を有するコリネ型細菌；２－チアゾールアラニン耐性に加えて、Ｌーヒスチジン、Ｌープロリン、Ｌースレオニン、Ｌーイソロイシン、ＬーメチオニンまたはＬートリプトファン要求性を有するコリネ型細菌（特開昭５４－４４０９６号）；ケトマロン酸、フルオロマロン酸又はモノフルオロ酢酸に耐性を有するコリ

ネ型細菌（特開昭 5 7 - 1 8 9 8 9 号）；アルギニノールに耐性を有するコリネ型細菌（特開昭 6 2 - 2 4 0 7 5 号）；または、X-グアニジン（Xは脂肪酸又は脂肪鎖の誘導体）に耐性を有するコリネ型細菌（特開平 2 - 1 8 6 9 9 5 号）等を用いて行われている。

【 0 0 0 3 】

一方、組換え DNA 技術により L-アルギニンの生合成酵素を増強することによって、L-アルギニンの生産能を増加させる種々の技術が開示されている。例えば、エシェリヒア属に属する微生物由来のアセチルオルニチンデアセチラーゼ、N-アセチルグルタミン酸-γ-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、N-アセチルグルタモキナーゼ、及びアルギニノサクシナーゼの遺伝子を含む DNA 断片とベクター DNA との組換え体 DNA を保有せしめたコリネバクテリウム属又はブレヴィバクテリウム属に属する微生物（特公平 5 - 2 3 7 5 0 号）を用いて L-アルギニンを製造する方法等が開示されている。

【 0 0 0 4 】

また、コリネ型細菌では、いくつかの L-アルギニン生合成系酵素の生成が、L-アルギニンにより抑制されていることが調べられている。さらに、L-アルギニン生合成系酵素のいくつかは、L-アルギニンによる抑制を受けるが、L-アルギニン蓄積量が向上したコリネ型細菌の変異株では、これらの酵素の L-アルギニンによる抑制が解除されていることが報告されている（Agric. Biol. Chem., 43(1), 105, 1979）。

【 0 0 0 5 】

一方、エシェリヒア・コリでは、L-アルギニン生合成系のリプレッサー及びリプレッサーをコードする遺伝子が特定されており（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1987), 84(19), 6697-701）、またリプレッサータンパクと各種 L-アルギニン生合成系遺伝子との結合相互作用についても調べられている（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1987), 84(19), 6697-701、J. Mol. Biol. (1992), 226, 367-386）。

【 0 0 0 6 】

しかしながら、コリネ型細菌では、L-アルギニン生合成系のリプレッサータ

ンパクは同定されていない。リプレッサータンパク遺伝子 (argR) については、遺伝子データベースGenBankに、その塩基配列とそれによってコードされると想定されるアミノ酸配列が登録されているが (AF049897)、これは前記アミノ酸配列と公知のアルギニンリプレッサーとの相同性からargRと命名されたものと考えられる。

【 0 0 0 7 】

【発明が解決しようとする課題】

前述のように、コリネ型細菌のL-アルギニン生合成系のリプレッサータンパク及びその遺伝子が推定されているが、リプレッサータンパク自体特定されておらず、機能等についても全く明らかにされていない。本発明は、コリネ型細菌のL-アルギニン生合成のリプレッサーを特定し、コリネ型細菌のL-アルギニン生産能を向上させることを課題とする。

【 0 0 0 8 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、遺伝子データベース中にargRとして登録されている遺伝子 (GenBank accession AF049897) のホモログをコリネ型細菌から単離し、同遺伝子をコリネ型細菌で増幅するとL-アルギニン生産能が低下し、一方、同遺伝子を破壊するとL-アルギニン生産能が向上することを見出し、コリネ型細菌もエシェリヒア・コリと同様にL-アルギニン生合成がリプレッサーによって抑制されていること、及び前記のargRとして登録されている遺伝子が、当該リプレッサーをコードしていることを確認し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、以下のとおりである。

【 0 0 0 9 】

(1) アルギニンリプレッサーが正常に機能せず、かつ、L-アルギニン生産能を有するコリネ型細菌。

(2) 前記コリネ型細菌は、染色体上のアルギニンリプレッサーをコードする遺伝子が破壊されたことにより、アルギニンリプレッサーが正常に機能しないことを特徴とする (1) のコリネ型細菌。

(3) 前記アルギニンリプレッサーは、配列番号 1 8 に示すアミノ酸配列又は同

アミノ酸配列と相同性を有するアミノ酸配列を有する(2)のコリネ型細菌。

(4) (1)～(3)のいずれかのコリネ型細菌を培地で培養し、培地中にL-アルギニンを生成蓄積せしめ、これを該培地から採取することを特徴とするL-アルギニンの製造法。

【0010】

本発明において「アルギニンリプレッサー」とは、L-アルギニン生合成を抑制する作用を有するタンパク質であり、コリネ型細菌において同タンパク質をコードする遺伝子の発現量が増加するとL-アルギニン生産能が低下し、発現量が低下又は消失するとL-アルギニン生産能が向上する。以下、アルギニンリプレッサーをコードする遺伝子をargR遺伝子ともいう。また、本発明において「L-アルギニン生産能」とは、本発明の微生物を培地に培養したときに、培地中にL-アルギニンを蓄積する能力をいう。

【0011】

【発明の実施の形態】

本発明の微生物は、アルギニンリプレッサーが正常に機能せず、L-アルギニン生産能を有するコリネ型細菌である。本発明のコリネ型細菌は、アルギニンリプレッサーが正常に機能しないことによりL-アルギニン生産能を有するものであってもよいし、L-アルギニン生産能を有するコリネ型細菌をアルギニンリプレッサーが正常に機能しないように育種したものであってもよい。また、コリネ型細菌をアルギニンリプレッサーが正常に機能しないように育種した後に、L-アルギニン生産能を付与したものであってもよい。

【0012】

コリネ型細菌は、従来ブレヴィバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属に統合された細菌を含み(Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1981))、またコリネバクテリウム属と非常に近縁なブレヴィバクテリウム属細菌を含む。このようなコリネ型細菌の例として以下のものが挙げられる。

【0013】

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム

コリネバクテリウム・アルカノリティカム
 コリネバクテリウム・カルナエ
 コリネバクテリウム・グルタミカム
 コリネバクテリウム・リリウム (コリネバクテリウム・グルタミカム)
 コリネバクテリウム・メラセコーラ
 コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス
 コリネバクテリウム・ハーキュリス
 ブレビバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム)
 ブレビバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム)
 ブレビバクテリウム・インマリオフィラム
 ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (コリネバクテリウム・グルタミ
 カム)
 ブレビバクテリウム・ロゼウム
 ブレビバクテリウム・サッカロリティカム
 ブレビバクテリウム・チオゲニタリス
 ブレビバクテリウム・アルバム
 ブレビバクテリウム・セリヌム
 ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム

【0014】

L-アルギニン生産能を有するコリネ型細菌としては、L-アルギニン生産能
 を有するものであれば特に制限されないが、例えば、コリネ型細菌野生株；サル
 ファ剤、2-チアゾールアラニン又は α -アミノ- β -ヒドロキシ吉草酸等の薬
 剤に耐性を有するコリネ型細菌；2-チアゾールアラニン耐性に加えて、L-ヒ
 スチジン、L-プロリン、L-スレオニン、L-イソロイシン、L-メチオニン
 またはL-トリプトファン要求性を有するコリネ型細菌（特開昭54-4409
 6号）；ケトマロン酸、フルオロマロン酸又はモノフルオロ酢酸に耐性を有する
 コリネ型細菌（特開昭57-18989号）；アルギニノールに耐性を有するコ
 リネ型細菌（特開昭62-24075号）；X-グアニジン（Xは脂肪酸又は脂
 肪鎖の誘導体）に耐性を有するコリネ型細菌（特開平2-186995号）等が

挙げられる。

【 0 0 1 5 】

具体的には、下記のような菌株を例示することができる。

ブレバクテリウム・フラバムAJ11169 (FERM P-4161)

ブレバクテリウム・ラクトファーメンタムAJ12092 (FERM P-7273)

ブレバクテリウム・フラバムAJ11336 (FERM P-4939)

ブレバクテリウム・フラバムAJ11345 (FERM P-4948)

ブレバクテリウム・ラクトファーメンタムAJ12430 (FERM BP-2228)

【 0 0 1 6 】

AJ11169株及びAJ12092株は特開昭 5 4 - 4 4 0 9 6 号記載の 2 - チアゾールアラニン耐性株、AJ11336株は特公昭 6 2 - 2 4 0 7 5 号記載のアルギニノール耐性及びサルファダイアジン耐性を有する株、AJ11345株は特公昭 6 2 - 2 4 0 7 5 号記載のアルギニノール耐性、2 - チアゾールアラニン耐性、サルファグアニジン耐性、及びヒスチジン要求性を有する株、及びAJ12430株は特開平 2 - 1 8 6 9 9 5 号記載のオクチルグアニジン耐性及び 2 - チアゾールアラニン耐性を有する株である。

【 0 0 1 7 】

リプレッサーが正常に機能しないコリネ型細菌は、argR遺伝子が、該遺伝子産物であるアルギニンリプレッサーの活性が低下又は消失するか、又はargR遺伝子の転写が低下または消失するように、改変することによって得られる。このようなコリネ型細菌は、例えば、遺伝子組換え法を用いた相同組換え法 (Experiment s in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory press (1972); Matsuyama, S. and Mizushima, S., J. Bacteriol., 162, 1196(1985)) により、染色体上のargR遺伝子を、正常に機能しないargR遺伝子 (以下、「破壊型argR遺伝子」ということがある) で置換することによって行うことができる。

【 0 0 1 8 】

染色体上の配列と相同性を有する配列を持つプラスミド等が菌体内に導入されると、ある頻度で相同性を有する配列の箇所で組換えを起こし、導入されたプラスミド全体が染色体上に組み込まれる。この後さらに染色体上の相同性を有する

配列の箇所で組換えを起こすと、再びプラスミドが染色体上から抜け落ちるが、この時組換えを起こす位置により破壊された遺伝子の方が染色体上に固定され、元の正常な遺伝子がプラスミドと一緒に染色体上から抜け落ちることもある。このような菌株を選択することにより、染色体上の正常なargR遺伝子が破壊型argR遺伝子と置換された菌株を取得することができる。

【0019】

このような相同組換えによる遺伝子破壊技術は既に確立しており、直鎖DNAを用いる方法、温度感受性プラスミドを用いる方法等が利用できる。また、薬剤耐性等のマーカー遺伝子が内部に挿入されたargR遺伝子を含み、かつ、目的とするコリネ型細菌細胞内で複製できないプラスミドを用いることによっても、argR遺伝子の破壊を行うことができる。すなわち、前記プラスミドで形質転換され、薬剤耐性を獲得した形質転換体は、染色体DNA中にマーカー遺伝子が組み込まれている。このマーカー遺伝子は、その両端のargR遺伝子配列と染色体上のargR遺伝子との相同組換えによって組み込まれる可能性が高いため、効率よく遺伝子破壊株を選択することができる。

【0020】

遺伝子破壊に用いる破壊型argR遺伝子は、具体的には、制限酵素消化及び再結合によるargR遺伝子の一定領域の欠失、argR遺伝子への他のDNA断片（マーカー遺伝子等）の挿入、または部位特異的変異法（Kramer, W. and Frits, H. J., *Methods in Enzymology*, 154, 350 (1987)）や次亜硫酸ナトリウム、ヒドロキシルアミン等の化学薬剤による処理（Shortle, D. and Nathans, D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75, 270 (1978)）によって、argR遺伝子のコーディング領域またはプロモーター領域等の塩基配列の中に1つまたは複数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を起こさせることにより、コードされるリプレッサーの活性を低下又は消失させるか、又はargR遺伝子の転写を低下または消失させることにより、取得することができる。これらの態様の中では、制限酵素消化及び再結合によりargR遺伝子の一定領域を欠失させる方法、又はargR遺伝子へ他のDNA断片を挿入する方法が、確実性及び安定性の点から好ましい。また、argR遺伝子とその周辺領域を含むプラスミドを鋳型とし、argR遺伝子の末端部又は

周辺領域に相当するプライマーを用いてPCR（ポリメラーゼ・チェーン・リアクション）を行い、argR遺伝子の内部又は全体を除く部分を増幅し、得られる増幅産物を環状化することによって、argR遺伝子破壊用プラスミドを作製することができる。後記実施例では、この方法によってargR遺伝子を破壊した。

【0021】

argR遺伝子は、コリネ型細菌の染色体DNAから、既知のargR遺伝子の塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとするPCR法によって取得することができる。また、コリネ型細菌の染色体DNAライブラリーから、既知のargR遺伝子の塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプローブとするハイブリダイゼーション法によって、argR遺伝子を取得することができる。尚、本発明においては、argR遺伝子は破壊型argR遺伝子の作製に用いるため、必ずしも全長を含む必要はなく、遺伝子破壊を起こすのに必要な長さを有していればよい。

【0022】

argR遺伝子は、コリネ型細菌のargR遺伝子と相同組換えを起こす程度の相同性を有していれば、由来を特に制限されない。コリネ型細菌のargR遺伝子として具体的には、配列番号17に示す塩基配列を有するブレヴィバクテリウム・フラバムのargR遺伝子、及び、コリネバクテリウム・グルタミカムのargR遺伝子（GenBank accession AF049897）が挙げられる。これらのargR遺伝子は相同性が高く、argR遺伝子を破壊するコリネ型細菌と種又は属が異なるコリネ型細菌のargR遺伝子であっても、遺伝子破壊に用いることができると考えられる。

本発明において、配列番号18に示すアミノ酸配列又は同アミノ酸配列と相同性を有するアミノ酸配列とは、配列番号18に示すアミノ酸配列をコードするargG遺伝子（例えば配列番号17に示す塩基配列を有するargG遺伝子）と相同組換えを起こす程度の相同性を有するargG遺伝子によってコードされるアミノ酸配列を意味する。

【0023】

PCRに用いるプライマーとしては、argR遺伝子を増幅することができるものであればよく、具体的には配列番号19及び配列番号20に示す塩基配列を有する

オリゴヌクレオチドが挙げられる。

【 0 0 2 4 】

また、マーカー遺伝子としては、カナマイシン耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子が挙げられる。カナマイシン耐性遺伝子は、ストレプトコッカス・フェカリスのカナマイシン耐性遺伝子を含む公知のプラスミド、例えばpDG783 (Anne-Marie Guerout- Fleury et al., Gene, 167, 335-337(1995)) からPCRにより増幅することにより取得することができる。

【 0 0 2 5 】

マーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子を用いる場合は、該遺伝子をプラスミド中のargR遺伝子の適当な部位に挿入し、得られるプラスミドで微生物を形質転換し、薬剤耐性となった形質転換体を選択すれば、argR遺伝子破壊株が得られる。染色体上のargR遺伝子が破壊されたことは、サザンブロッティングやPCR法により、染色体上のargR遺伝子又はマーカー遺伝子を解析することによって、確認することができる。前記カナマイシン耐性遺伝子が染色体DNAに組み込まれたことの確認は、カナマイシン耐性遺伝子を増幅することができるプライマー（例えば配列番号1及び2に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド）を用いたPCRにより、行うことができる。

【 0 0 2 6 】

上記のようにして得られるアルギニンリプレッサーが正常に機能せず、かつ、L-アルギニン生産能を有するコリネ型細菌を培地で培養し、該培養物中にL-アルギニンを生成蓄積せしめ、該培養物からL-アルギニンを採取することにより、L-アルギニンを効率よく製造することができる。

【 0 0 2 7 】

使用する培地は、微生物を用いたアミノ酸の発酵生産に従来より用いられてきた周知の培地を用いてかまわない。つまり、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機成分を含有する通常の培地である。

【 0 0 2 8 】

炭素源としては、グルコース、シュクロース、ラクトース、ガラクトース、フラクトースやでんぷんの加水分解物などの糖類、グリセロールやソルビトールな

どのアルコール類、フマル酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸類を用いることができる。

【0029】

窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。

【0030】

有機微量栄養源としては、ビタミンB₁、L-ホモセリンなどの要求物質または酵母エキス等を適量含有させることが望ましい。これらの他に、必要に応じて、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。

【0031】

培養は好氣的条件下で1～7日間実施するのがよく、培養温度は24℃～37℃、培養中のpHは5～9がよい。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができる。発酵液からのL-アルギニンの採取は通常イオン交換樹脂法その他の公知の方法を組み合わせることにより実施できる。

【0032】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

【0033】

【実施例1】エシェリヒア・コリとコリネ型細菌のシャトルベクター及び温度感受性ベクターの構築

はじめに、コリネ型細菌にargR遺伝子を導入するためのベクター、及びコリネ型細菌のargR欠失株を作製するための温度感受性ベクターを構築した。

<1>ストレプトコッカス・フェカリスの薬剤耐性遺伝子を持つベクターの構築

ストレプトコッカス・フェカリスのカナマイシン耐性遺伝子を、同遺伝子を含む公知のプラスミドからPCRにより増幅した。ストレプトコッカス・フェカリスのカナマイシン耐性遺伝子の塩基配列は既に明らかにされている (Trieu-Cuot, P

and Courvalin, P.: Gene 23 (3), 331-341 (1983))。この配列を基に配列番号 1 および 2 に示すプライマーを合成し、pDG783 (Anne-Marie Guerout- Fleury et al., Gene, 167, 335-337(1995)) を鋳型として PCR を行ない、カナマイシン耐性遺伝子とそのプロモーターを含む DNA 断片を増幅した。

【 0 0 3 4 】

上記 DNA 断片を宝酒造社製の SUPREC02 にて精製した後、制限酵素 HindIII と Hinc II で完全分解し平滑末端化した。平滑末端化は宝酒造社製の Blunting Kit により行なった。この DNA 断片と、配列番号 3 および 4 に示すプライマーを用いて pHSG399 (S. Takeshita et al : Gene 61, 63-74 (1987) 参照) を鋳型として PCR を行って得られた増幅産物を精製し平滑末端化した DNA 断片とを、混合し連結した。連結反応は宝酒造社製 DNA ligation kit ver2 にて行なった。連結した DNA を用いて、エシェリヒア・コリ JM109 のコンピテントセル (宝酒造社製) を形質転換し、IPTG (イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド) 10 μ g/ml、X-Gal (5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトシド) 40 μ g/ml 及びカナマイシン 25 μ g/ml を含む L 培地 (バクトトリプトン 10g/L、バクトイーストエキストラクト 5g/L、NaCl 5g/L、寒天 15g/L、pH7.2) に塗布し、一晚培養後、出現した青色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換株を得た。

【 0 0 3 5 】

形質転換株からアルカリ法 (生物工学実験書、日本生物工学会編、105 頁、培風館、1992 年) を用いてプラスミドを調製し、制限酵素地図を作成し、図 1 に示す制限酵素地図と同等であるものを pK1 と名付けた。このプラスミドはエシェリヒア・コリ中にて安定に保持され、宿主にカナマイシン耐性を付与する。また、*lacZ'* 遺伝子を含むため、クローニングベクターに適している。

【 0 0 3 6 】

< 2 > シャトルベクター pSFK6 の構築

温度感受性複製制御領域の取得の材料として、エシェリシア・コリと、コリネ型細菌の双方の菌体中で自律複製可能なプラスミドベクターを作製した。ブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC13869 より抽出したプラスミド pAM330 (特開昭 58-67699 号公報参照) を制限酵素 HindIII で完全分解したのち平滑末端化し

、これと、上記pK1を制限酵素BsaAIで完全分解したものを、連結した。連結後のDNAを用いてブレビバクテリウム・ラクトファーマメンタムATCC13869を形質転換した。形質転換の方法は、電気パルス法（特開平2-207791号参照）を用いた。形質転換体の選択は、カナマイシン25 μ g/mlを含むM-CM2Bプレート（ポリペプトン10g/L、酵母エキス10g/L、NaCl 5g/L、ビオチン10 μ g/L、寒天15g/L、pH7.2）にて行った。二晩培養後、コロニーを釣り上げ単コロニー分離し、形質転換体とした。形質転換体からプラスミドDNAを調製し、制限酵素地図を作成し、図2に示す制限酵素切断地図と同一の制限酵素地図を持つものをpSFK6と命名した。このプラスミドは、エシェリシア・コリとコリネ型細菌中で自律複製でき、宿主にカナマイシン耐性を付与する。

【 0 0 3 7 】

< 3 > 温度感受性複製制御領域をもつプラスミドの取得

pSFK6をインビトロでヒドロキシルアミン処理した。ヒドロキシルアミン処理は、公知の方法（G. O. Humpherys et al., Molec. Gen. Genet., 145, 101-108 (1976)等参照）によった。処理後のDNAを回収し、ブレビバクテリウム・ラクトファーマメンタムATCC13869株を形質転換した。形質転換体は、カナマイシン25 μ g/mlを含むCM2Bプレート上で低温（25℃）にて選択した。出現した形質転換体を、同様の選択プレートにレプリカし、高温（34℃）にて培養した。高温でカナマイシンを含む選択プレート上で生育できない株1株を取得した。この株から、プラスミドを回収しp48Kと命名した。

【 0 0 3 8 】

< 4 > 温度感受性複製制御領域の塩基配列の決定

野生型の複製制御領域を持つプラスミドpSFK6、および温度感受性型の複製制御領域を持つプラスミドp48Kについて、それぞれの複製制御領域部分の塩基配列を決定した。塩基配列は、ABI社のDNA Sequencing Kitを用いてABI社の全自動シーケンサーABI310にて決定した。その結果、野生型複製制御領域と、温度感受性変異型複製制御領域の間には、6個の塩基置換があることが判明した。pSFK6に含まれるコリネ型細菌中で機能する複製制御領域部分（pAM330由来の全配列）の塩基配列を配列番号5に、p48Kに含まれるコリネ型細菌中で機能する温度感受性

複製制御領域部分の塩基配列を配列番号 7 に示す。また、これらの塩基配列中に存在する ORF によってコードされ得るアミノ酸配列を配列番号 6 及び 8 に示す。温度感受性複製制御領域では、配列上の 1255 番目の C が T に、1534 番目の C が T に、1866 番目の G が A に、2058 番目の G が A に、2187 番目の C が T に、3193 番目の G が A に変異している。このうちアミノ酸変異を伴うものは 1534 番目の変異点のみであり、プロリンからセリンへの置換を引き起こす。

【 0 0 3 9 】

< 5 > 温度感受性変異を有するシャトルベクターの構築

p48K が持つ 6 個の変異を、一点ずつシャトルベクター pSFK6 に導入した (図 3 参照)。変異の導入は、公知の方法 (Mikaelian, I., Sergeant, A. *Nucleic Acids Res.*, 20, 376 (1992)) によって行った。具体的方法を以下に示す。3193 番目の G→A の変異を導入するために、配列番号 9 および 10 に示すプライマーの組み合わせと、配列番号 11 および 12 に示すプライマーの組み合わせを用いて、pAM330 を鋳型として PCR を行なった。得られた増幅産物はそれぞれアガロースゲルで電気泳動後、ゲルから回収することにより精製した。ゲルからの DNA 断片の回収は宝酒造社製の EASYTRAP Ver.2 にて行なった。精製した DNA を 1:1 のモル比となるように混合し、これを鋳型として配列番号 13 および 14 に示すプライマーを用いて PCR 反応を行なった。増幅産物は制限酵素 MluI で完全分解し、アガロースゲルにて電気泳動後、およそ 3.2Kb の DNA 断片を回収した。pSFK6 も同様に制限酵素 MluI で完全分解し、アガロースゲルにて電気泳動後、およそ 3.8Kb の DNA 断片を回収した。得られた DNA 断片を混合して連結し、エシェリヒア・コリ JM109 のコンピテントセル (宝酒造社製) を用いて形質転換を行い、カナマイシン 25 μ g/ml を含む L 培地に塗布し、一晚培養後、出現したコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換株を得た。形質転換株からアルカリ法を用いてプラスミドを調製し、塩基配列を決定し、配列番号 5 に示す配列の 3193 番目の G が A に変異していることを確認した。このプラスミドを pSFKT6 と名付けた (図 3)。

【 0 0 4 0 】

【実施例 2】 argR 遺伝子のクローニングとコリネ型細菌での増幅効果

ブレバクテリウム・フラバム野生株 2247 (AJ14067) の染色体 DNA を鋳型とし

、配列番号 1 5（配列番号 1 7 の塩基番号 1717 から 1741 の配列）および配列番号 1 6（配列番号 1 7 の塩基番号 2386 から 2362 の配列に相補的な配列）に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（プライマー 1, 2）をプライマーとして PCR を行った。PCR は、Pyrobest DNA polymerase（宝酒造）を用い、9 8℃ 1 0 秒、5 8℃ 1 分、7 2℃ 3 分を 1 サイクルとして 3 0 サイクル行った。得られた増幅断片を、実施例 1 で得たシャトルベクター pSFK6 の SmaI サイトに挿入し、コリネ型細菌で自律複製可能なプラスミド pWR を得た。

【0 0 4 1】

コリネ型細菌の L-アルギニン生産菌での argR 遺伝子の増幅効果を調べるため、pWR を L-アルギニン生産菌 *ブレヴィバクテリウム・フラバム* AJ113455 株（FERM BP-6894）に導入した。プラスミドの導入は、電気パルス法（特開平 2-207791 号）を用いた。形質転換体は、カナマイシン 25 μ g/ml を含む CH2G 寒天培地（グルコース 5g、NaCl 5g、寒天 15g を純水 1L に含む。pH 7.2）にてカナマイシン耐性株として選択し、AJ11345/pWR を得た。対照として、AJ11345 株に pSFK6 を同様にして導入し、形質転換体 AJ11345/pSFK6 を得た。

【0 0 4 2】

上記各菌株を、グルコース 0.5g/dl、ポリペプトン 1g/dl、酵母エキス 1g/dl、NaCl 0.5g/dl を含む寒天培地にぬりつけ、31.5℃ で 20 時間培養した。得られた菌体 1 エーゼを、グルコース 4g/dl、硫酸アンモニウム 6.5g/dl、 KH_2PO_4 0.1g/dl、 MgSO_4 0.04g/dl、 FeSO_4 0.001g/dl、 MnSO_4 0.001g/dl、ビタミン B₁ 5 μ g/dl、ビオチン 5 μ g/dl、大豆加水分解物（N 量として 45mg/dl）を含む培地に植菌し、フラスコにて 31.5℃ で 50 時間振とう培養を行った。各々の培養液中の L-アルギニン蓄積量（濃度 (g/dl)）を測定した結果を表 1 に示す。その結果、argR 増幅株では、ほとんど L-アルギニンを蓄積しなくなった。このことから、argR 遺伝子産物がアルギニンリプレッサーとして機能していることが示された。

【0 0 4 3】

【表 1】

表 1

菌株	L-アルギニン蓄積量 (g/dl)
AJ11345/pSFK6	1.3
AJ11345/pWR	0.2

【0044】

pWRにクローニングされた挿入断片の塩基配列を決定した結果を配列番号17に示す。同塩基配列によってコードされ得るアミノ酸配列を配列番号18に示す。

【0045】

【実施例3】 コリネ型細菌のargR破壊株の構築及びアルギニンリプレッサー欠失の効果

<1>argR破壊用プラスミドの作製

ブレヴィバクテリウム・フラバム野生株2247株 (AJ14067) の染色体DNAを鋳型とし、配列番号19 (配列番号17の塩基番号4から28の配列) および配列番号20 (配列番号17の塩基番号4230から4211の配列に相補的な配列) に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド (プライマー3, 4) をプライマーとしてPCRを行った。PCRは、Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、98℃10秒、58℃1分、72℃3分を1サイクルとして30サイクル行った。得られた増幅断片を、クローニングベクターpHSG399のマルチクローニングサイト内のSmaIサイトに挿入した。

【0046】

挿入されたDNA断片からアルギニンリプレッサーをコードしていると思われるORF全てを欠失させるために、配列番号21 (配列番号17の塩基番号2372から2395の配列) および配列番号22 (配列番号17の塩基番号1851から1827の配列に相補的な配列) に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド (プライマー5, 6) をプライマーとし、増幅断片が挿入されたpHSG399を鋳型をしてPCRを行った。PCR産物をセルフライゲーションすることにより、pssERを構築した。

【0047】

次に、pssERを制限酵素SmaIおよびSalIで消化して得た断片と、実施例1で得た温度感受性プラスミドpSFKT6をSmaI、SalIで消化したものを連結することにより、コリネ型細菌で自律複製能が温度感受性になったargR破壊用プラスミドpssERTを得た。

【0048】

<2>相同組換えによるコリネ型細菌のアルギニンリプレッサー欠失株の取得

上記のようにして得たプラスミドpssERTを、ブレビバクテリウム・ラクトファーマメンタムAJ13029株 (FERM BP-5189) に導入した。プラスミドの導入は電気パルス法 (特開平2-207791号) を用いた。本プラスミドは、ブレビバクテリウム・ラクトファーマメンタム中で自律複製能が温度感受性である為、本プラスミドが相同組換えによって染色体に組み込まれた株のみが、プラスミド複製の非許容温度である34℃でカナマイシン耐性株として選択できる。argR破壊用プラスミドが染色体に組み込まれた株は、25 µg/mlのカナマイシンを含むCM2G培地プレート (ポリペプトン10g、酵母エキス10g、グルコース5g、NaCl 5g、寒天15gを純水1Lに含む。pH7.2) にて、カナマイシン耐性株として選択した。この段階では、染色体由来の正常なargR遺伝子と、プラスミド由来のORFが欠失したargG遺伝子とが、プラスミド部分を挟んで染色体上にタンデムに存在する。

【0049】

次に、組換え株を、再度相同組換えを起こさせ、プラスミド複製の非許容温度34℃でカナマイシン感受性になった株を選択することにより、プラスミド部分とともにargR遺伝子の一方が脱落した株を選択した。これらの株は、染色体上に正常なargR遺伝子が残された株と、破壊型argR遺伝子が残された株とが存在する。これらの中から、破壊型argR遺伝子のみを保持する株を選択した。染色体上のargR遺伝子が破壊型であるかどうかは、34℃でカナマイシン感受性になった株の染色体を調製し、これを鋳型とし、配列番号19および配列番号20に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド (プライマー3, 4) をプライマーとしてPCRを行い、親株由来の染色体を鋳型にして同様にPCRを行ったものよりも、PCR産物が約600bp短くなることで確認することができる。

【0050】

上記のようにして選択されたargR破壊株のPCR産物のダイレクトシーケンスを行い、目的どおりargR遺伝子が破壊されていることを確認し、AJ13029ΔR株を得た。

【 0 0 5 1 】

< 3 > argR破壊株による L-アルギニンの生産

AJ13029ΔR株を、グルコース0.5g/dl、ポリペプトン 1g/dl、酵母エキス 1g/dl、NaCl 0.5g/dlを含む寒天培地にぬりつけ、31.5℃で20時間培養した。得られた菌体1エーゼを、グルコース3g/dl、硫酸アンモニウム6.5g/dl、KH₂PO₄ 0.1g/dl、MgSO₄ 0.04g/dl、FeSO₄ 0.001g/dl、MnSO₄ 0.001g/dl、ビタミンB₁ 300 μg/dl、ビオチン200 μg/dl、大豆加水分解物（N量として165mg/dl）を含み、NaOHでpH7.0に調整した培地に植菌し、31.5℃で24時間シード培養を行った。

【 0 0 5 2 】

上記シード培養液1mlを、グルコース4g/dl、硫酸アンモニウム6.5g/dl、KH₂PO₄ 0.5g/dl、MgSO₄ 0.04g/dl、FeSO₄ 0.001g/dl、MnSO₄ 0.01g/dl、ビタミンB₁ 5 μg/dl、ビオチン5 μg/dl、大豆加水分解物（N量として45mg/dl）を含み、KOHでpHを7.0に調整した培地に植菌し、フラスコにて31.5℃で50時間振とう培養を行った。各菌株の培養液中のL-アルギニン蓄積量（濃度(mg/dl)）を測定した結果を表2に示す。その結果、argR破壊株は、親株に比べて著量のL-アルギニンを生成した。

【 0 0 5 3 】

【表2】

表 2

菌株	L-アルギニン蓄積量 (mg/dl)
AJ13029	20
AJ13029ΔR	120

【 0 0 5 4 】

【配列表の説明】

配列番号 1 : ストレプトコッカス・フェカリスのカナマイシン耐性遺伝子増幅用プライマー

配列番号 2 : ストレプトコッカス・フェカリスのカナマイシン耐性遺伝子増幅用プライマー

配列番号 3 : pHSG399のベクター部分増幅用プライマー

配列番号 4 : pHSG399のベクター部分増幅用プライマー

配列番号 5 : pSFK6の複製制御領域部分の塩基配列

配列番号 6 : pSFK6中のORFによってコードされ得るアミノ酸配列

配列番号 7 : p48Kの複製制御領域部分の塩基配列

配列番号 8 : p48K中のORFによってコードされ得るアミノ酸配列

配列番号 9 : pSFK6に3193番目のG→Aの変異を導入するための第 1 回目PCR用プライマー

配列番号 10 : pSFK6に3193番目のG→Aの変異を導入するための第 1 回目PCR用プライマー

配列番号 11 : pSFK6に3193番目のG→Aの変異を導入するための第 1 回目PCR用プライマー

配列番号 12 : pSFK6に3193番目のG→Aの変異を導入するための第 1 回目PCR用プライマー

配列番号 13 : pSFK6に3193番目のG→Aの変異を導入するための第 2 回目PCR用プライマー

配列番号 14 : pSFK6に3193番目のG→Aの変異を導入するための第 2 回目PCR用プライマー

配列番号 15 : argR遺伝子増幅用プライマー

配列番号 16 : argR遺伝子増幅用プライマー

配列番号 17 : argR遺伝子を含むDNA断片の塩基配列

配列番号 18 : 前記DNA断片がコードし得るアミノ酸配列

配列番号 19 : argR遺伝子増幅用プライマー

配列番号 20 : argR遺伝子増幅用プライマー

配列番号21 : argR遺伝子を含むプラスミドのargR遺伝子ORF以外の部分を増幅するためのプライマー

配列番号22 : argR遺伝子を含むプラスミドのargR遺伝子ORF以外の部分を増幅するためのプライマー

【 0 0 5 5 】

【発明の効果】

本発明により、L-アルギニン生産能を有するコリネ型細菌のL-アルギニン生産能を向上させることができる。

【 0 0 5 6 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 味の素株式会社

<120> コリネ型細菌のアルギニンリプレッサー欠失株及びL-アルギニンの製造法

<130> P-7232

<140>

<141> 2000-04-28

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.0

【 0 0 5 7 】

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
amplifying kanamycin resistant gene of
Streptococcus faecalis

<400> 1

cccgtaaact gcttgaaacc caggacaata ac

32

【 0 0 5 8 】

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
amplifying kanamycin resistant gene of
Streptococcus faecalis

<400> 2

cccgtaaaca tgtacttcag aaaagattag

30

【 0 0 5 9 】

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for

amplifying Escherichia coli cloning vector pHSG399

<400> 3

gatatctacg tgccgatcaa cgtctc

26

【0060】

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
amplifying Escherichia coli cloning vector pHSG399

<400> 4

aggccttttt ttaaggcagt tattg

25

【0061】

<210> 5

<211> 4447

<212> DNA

<213> Brevibacterium lactofermentum

<220>

<221> CDS

<222> (1318)..(2598)

<400> 5

aagcttgtct acgtctgatg ctttgaatcg gacggacttg ccgatcttgt atgcggtgat 60

tttccctcg ttgcccact ttttaatggt ggccgggggtg agagctacgc gggcggcgac 120

ctgctgcgct gtgatccaat attcggggtc gttcactggt tcccccttct gatttctggc 180
 atagaagaac ccccgatgaac tgtgtgggtc cgggggttgc tgatttttgc gagacttctc 240
 gcgcaattcc ctagcttagg tgaaaacacc atgaaacact agggaaacac ccatgaaaca 300
 cccattaggg cagtagggcg gcttcttcgt ctagggcttg catttgggcg gtgatctggt 360
 ctttagcgtg tgaaagtgtg tcgtaggtgg cgtgctcaat gcactcgaac gtcacgtcat 420
 ttaccgggtc acgggtgggca aagagaacta gtgggttaga cattgttttc ctcgttgtcg 480
 gtgggtggta gcttttctag ccgctcggta aacgcggcga tcatgaactc ttggaggttt 540
 tcaccgttct gcatgcctgc gcgcttcacg taactcacgta gtgccaaagg aacgcgtgcg 600
 gtgaccacga cgggcttagc ctttgcctgc gcttcttagt cttcgatggt ggcttgtgcc 660
 tgcgcttgct gcgcctgtag tgcctgttga gcttcttgta gttgctgttc tagctgtgcc 720
 ttggttgcca tgctttaaga ctctagtagc tttcctgcga tatgtcatgc gcatgcgtag 780
 caaacattgt cctgcaactc attcattatg tgcagtgtc ctgttactag tcgtacatac 840
 tcatatttac ctagtctgca tgcagtgcac gcacatgcag tcatgtcgtg ctaatgtgta 900
 aaacatgtac atgcagattg ctgggggtgc agggggcgga gccaccctgt ccatgcgggg 960
 tgtggggctt gccccgccgg tacagacagt gagcaccggg gcacctagtc gcggataccc 1020
 cccctaggta tcggacacgt aaccctccca tgcgatgca aatctttaac attgagtacg 1080
 ggtaagctgg cagcatagc caagctaggc ggccaccaa caccactaaa aattaatagt 1140
 ccctagacaa gacaaacccc cgtgcgagct accaactcat atgcacgggg gccacataac 1200
 ccgaagggtt ttcaattgac aaccatagca ctagctaaga caacgggcac aacacccgca 1260
 caaactcgca ctgcgcaacc ccgcacaaca tcgggtctag gtaacactga aatagaa 1317
 gtg aac acc tct aag gaa ccg cag gtc aat gag ggt tct aag gtc act 1365

Val Asn Thr Ser Lys Glu Pro Gln Val Asn Glu Gly Ser Lys Val Thr

1 5 10 15

cgc gct agg gcg tgg cgt agg caa aac gtc atg tac aag atc acc aat 1413

Arg Ala Arg Ala Trp Arg Arg Gln Asn Val Met Tyr Lys Ile Thr Asn

20 25 30

agt aag gct ctg gcg ggg tgc cat agg tgg cgc agg gac gaa gct gtt 1461

Ser Lys Ala Leu Ala Gly Cys His Arg Trp Arg Arg Asp Glu Ala Val

35 40 45

gcg gtg tcc tgg tcg tct aac ggt gct tcg cag ttt gag ggt ctg caa	1509
Ala Val Ser Trp Ser Ser Asn Gly Ala Ser Gln Phe Glu Gly Leu Gln	
50 55 60	
aac tct cac tct cgc tgg ggg tca cct ctg gct gaa ttg gaa gtc atg	1557
Asn Ser His Ser Arg Trp Gly Ser Pro Leu Ala Glu Leu Glu Val Met	
65 70 75 80	
ggc gaa cgc cgc att gag ctg gct att gct act aag aat cac ttg gcg	1605
Gly Glu Arg Arg Ile Glu Leu Ala Ile Ala Thr Lys Asn His Leu Ala	
85 90 95	
gcg ggt ggc gcg ctc atg atg ttt gtg ggc act gtt cga cac aac cgc	1653
Ala Gly Gly Ala Leu Met Met Phe Val Gly Thr Val Arg His Asn Arg	
100 105 110	
tca cag tca ttt gcg cag gtt gaa gcg ggt att aag act gcg tac tct	1701
Ser Gln Ser Phe Ala Gln Val Glu Ala Gly Ile Lys Thr Ala Tyr Ser	
115 120 125	
tcg atg gtg aaa aca tct cag tgg aag aaa gaa cgt gca cgg tac ggg	1749
Ser Met Val Lys Thr Ser Gln Trp Lys Lys Glu Arg Ala Arg Tyr Gly	
130 135 140	
gtg gag cac acc tat agt gac tat gag gtc aca gac tct tgg gcg aac	1797
Val Glu His Thr Tyr Ser Asp Tyr Glu Val Thr Asp Ser Trp Ala Asn	
145 150 155 160	
ggt tgg cac ttg cac cgc aac atg ctg ttg ttc ttg gat cgt cca ctg	1845
Gly Trp His Leu His Arg Asn Met Leu Leu Phe Leu Asp Arg Pro Leu	
165 170 175	
tct gac gat gaa ctc aag gcg ttt gag gat tcc atg ttt tcc cgc tgg	1893
Ser Asp Asp Glu Leu Lys Ala Phe Glu Asp Ser Met Phe Ser Arg Trp	
180 185 190	
tct gct ggt gtg gtt aag gcc ggt atg gac gcg cca ctg cgt gag cac	1941
Ser Ala Gly Val Val Lys Ala Gly Met Asp Ala Pro Leu Arg Glu His	

195	200	205	
ggg gtc aaa ctt gat cag gtg tct acc tgg ggt gga gac gct gcg aaa			1989
Gly Val Lys Leu Asp Gln Val Ser Thr Trp Gly Gly Asp Ala Ala Lys			
210	215	220	
atg gca acc tac ctc gct aag ggc atg tct cag gaa ctg act ggc tcc			2037
Met Ala Thr Tyr Leu Ala Lys Gly Met Ser Gln Glu Leu Thr Gly Ser			
225	230	235	240
gct act aaa acc gcg tct aag ggg tcg tac acg ccg ttt cag atg ttg			2085
Ala Thr Lys Thr Ala Ser Lys Gly Ser Tyr Thr Pro Phe Gln Met Leu			
245	250	255	
gat atg ttg gcc gat caa agc gac gcc ggc gag gat atg gac gct gtt			2133
Asp Met Leu Ala Asp Gln Ser Asp Ala Gly Glu Asp Met Asp Ala Val			
260	265	270	
ttg gtg gct cgg tgg cgt gag tat gag gtt ggt tct aaa aac ctg cgt			2181
Leu Val Ala Arg Trp Arg Glu Tyr Glu Val Gly Ser Lys Asn Leu Arg			
275	280	285	
tcg tcc tgg tca cgt ggg gct aag cgt gct ttg ggc att gat tac ata			2229
Ser Ser Trp Ser Arg Gly Ala Lys Arg Ala Leu Gly Ile Asp Tyr Ile			
290	295	300	
gac gct gat gta cgt cgt gaa atg gaa gaa gaa ctg tac aag ctc gcc			2277
Asp Ala Asp Val Arg Arg Glu Met Glu Glu Glu Leu Tyr Lys Leu Ala			
305	310	315	320
ggg ctg gaa gca ccg gaa cgg gtc gaa tca acc cgc gtt gct gtt gct			2325
Gly Leu Glu Ala Pro Glu Arg Val Glu Ser Thr Arg Val Ala Val Ala			
325	330	335	
ttg gtg aag ccc gat gat tgg aaa ctg att cag tct gat ttc gcg gtt			2373
Leu Val Lys Pro Asp Asp Trp Lys Leu Ile Gln Ser Asp Phe Ala Val			
340	345	350	
agg cag tac gtt cta gat tgc gtg gat aag gct aag gac gtg gcc gct			2421

Arg Gln Tyr Val Leu Asp Cys Val Asp Lys Ala Lys Asp Val Ala Ala
 355 360 365
 gcg caa cgt gtc gct aat gag gtg ctg gca agt ctg ggt gtg gat tcc 2469
 Ala Gln Arg Val Ala Asn Glu Val Leu Ala Ser Leu Gly Val Asp Ser
 370 375 380
 acc ccg tgc atg atc gtt atg gat gat gtg gac ttg gac gcg gtt ctg 2517
 Thr Pro Cys Met Ile Val Met Asp Asp Val Asp Leu Asp Ala Val Leu
 385 390 395 400
 cct act cat ggg gac gct act aag cgt gat ctg aat gcg gcg gtg ttc 2565
 Pro Thr His Gly Asp Ala Thr Lys Arg Asp Leu Asn Ala Ala Val Phe
 405 410 415
 gcg ggt aat gag cag act att ctt cgc acc cac taaaagcggc ataaaccccg 2618
 Ala Gly Asn Glu Gln Thr Ile Leu Arg Thr His
 420 425
 ttcgatatatt tgtgcgatga atttatggtc aatgtcgcgg gggcaaacta tgatgggtct 2678
 tgttgttgac aatggctgat ttcacagga atggaactgt catgctgtta tgtgcctggc 2738
 tcctaatacaa agctggggac aatgggttgc cccgttgatc tgatctagtt cggattggcg 2798
 gggcttcaact gtatctgggg gtggcatcgt gaatagattg cacaccgtag tgggcagtgt 2858
 gcacaccata gtgggcatga gtaataccta cgcgcgcgtg ggctagggct taacgcgcgt 2918
 ttigccgtgc tgcggggcat acgttagcgc atacgctttt ttctgtgaaa cttttttgtg 2978
 ttgttgtttc gtgttggttt cttttctgtt ggcggggcaa cttaacgcct gcgggggtgg 3038
 ttgttgacgt taacgggggt agtttttatt cccctagtgg tttttcagta cgacaatcga 3098
 gaaagacctg tttcagccag ttcgggtcat gttcgtcggg atggccacgt gcatagcgac 3158
 cagttttcga gttcactggg atttttgggt catcgaacaa gatgtaggac aatgcggttt 3218
 ctaggtctac tttttgcttt atgccgtaca agccccgtgg gtattcagcg attgattcca 3278
 aggcggttc ccagtcctgt tttgtgaagg actggcttag ttctaggtct gtgtctgggt 3338
 agtactgctt gtttgtgtaa gcgccgttgg tgctcattga tgattccttt gaagtgtttg 3398
 gagttcggct agtagtgcgg cgtatgggtg tgctttttgc tcgtgatagc tcgccttggc 3458
 tatgaggtcg gctaggtagg ttccgggggt gcctaggttg cgtaggtcta gcaaattccg 3518

gtatgtggcc tgtgcgtgc gctggtggtg catacagtcg ttaagctggg cttttacgtc 3578
 tgcgatgcgg tggcggtag gcatgttggt gtgcttcttc caagtactca cgggcgggtt 3638
 ttgtgtatgc ctggcgtgat gcttctttga gctgttgag ttccgcttg agtgccggta 3698
 gttcgtccgc gaactgcttg tggtagctgt atttctcttg ttccctgggcg atagcatttg 3758
 cgttgaattg cagggcgggt agttcgtcca cgcgtcgtt tgctgcgttg gtcattggtg 3818
 cgtgccattt gcggttggtg acgcgggggt caaggttgcg cacggctgct tcggctaggt 3878
 tggtagctgc ttttttcagt gctcgggctt cccgttcctc gtccaacgag agcacctttg 3938
 gtttgttggtc ttccgctagt ttttgcttct ccgctttgat gagttggtca acttcgtgtt 3998
 gggagaggtc gtttttcacg atgcgtcgaa tgtggtcgtt gtgggtgctg agttggtgtg 4058
 agaggtagtg gggttctggg atttcggcga gttggtcgag gttggtgtag tgcgggttgc 4118
 ggcttggttg gttgggttcg ctggggaggt cgatgtatcc ggttgagtct ccggcgtggt 4178
 tgaagtgaat taggcgttg tagccgtatt cctggttggg gaggtacgac agaatgagga 4238
 agtttgggtc ttctcctgca atgagtcgtg cgtgttcgta gttcgggtact gggtcgtgct 4298
 cggggagaat gttcttttgg gtcattgctt ctctttctgt tgctctgtaa gtccgtatgt 4358
 gggcatggga aagccccggc aaccctttgg gtcaaccggg gctagatagt cgcttagaat 4418
 ggcttctagg ctgcgtctcg ggggtgtggc 4447

【0062】

<210> 6

<211> 427

<212> PRT

<213> Brevibacterium lactofermentum

<400> 6

Val Asn Thr Ser Lys Glu Pro Gln Val Asn Glu Gly Ser Lys Val Thr

1 5 10 15

Arg Ala Arg Ala Trp Arg Arg Gln Asn Val Met Tyr Lys Ile Thr Asn

20 25 30

Ser Lys Ala Leu Ala Gly Cys His Arg Trp Arg Arg Asp Glu Ala Val

35 40 45

Ala Val Ser Trp Ser Ser Asn Gly Ala Ser Gln Phe Glu Gly Leu Gln
 50 55 60
 Asn Ser His Ser Arg Trp Gly Ser Pro Leu Ala Glu Leu Glu Val Met
 65 70 75 80
 Gly Glu Arg Arg Ile Glu Leu Ala Ile Ala Thr Lys Asn His Leu Ala
 85 90 95
 Ala Gly Gly Ala Leu Met Met Phe Val Gly Thr Val Arg His Asn Arg
 100 105 110
 Ser Gln Ser Phe Ala Gln Val Glu Ala Gly Ile Lys Thr Ala Tyr Ser
 115 120 125
 Ser Met Val Lys Thr Ser Gln Trp Lys Lys Glu Arg Ala Arg Tyr Gly
 130 135 140
 Val Glu His Thr Tyr Ser Asp Tyr Glu Val Thr Asp Ser Trp Ala Asn
 145 150 155 160
 Gly Trp His Leu His Arg Asn Met Leu Leu Phe Leu Asp Arg Pro Leu
 165 170 175
 Ser Asp Asp Glu Leu Lys Ala Phe Glu Asp Ser Met Phe Ser Arg Trp
 180 185 190
 Ser Ala Gly Val Val Lys Ala Gly Met Asp Ala Pro Leu Arg Glu His
 195 200 205
 Gly Val Lys Leu Asp Gln Val Ser Thr Trp Gly Gly Asp Ala Ala Lys
 210 215 220
 Met Ala Thr Tyr Leu Ala Lys Gly Met Ser Gln Glu Leu Thr Gly Ser
 225 230 235 240
 Ala Thr Lys Thr Ala Ser Lys Gly Ser Tyr Thr Pro Phe Gln Met Leu
 245 250 255
 Asp Met Leu Ala Asp Gln Ser Asp Ala Gly Glu Asp Met Asp Ala Val
 260 265 270
 Leu Val Ala Arg Trp Arg Glu Tyr Glu Val Gly Ser Lys Asn Leu Arg

275	280	285
Ser Ser Trp Ser Arg Gly Ala Lys Arg Ala Leu Gly Ile Asp Tyr Ile		
290	295	300
Asp Ala Asp Val Arg Arg Glu Met Glu Glu Glu Leu Tyr Lys Leu Ala		
305	310	315
Gly Leu Glu Ala Pro Glu Arg Val Glu Ser Thr Arg Val Ala Val Ala		
325	330	335
Leu Val Lys Pro Asp Asp Trp Lys Leu Ile Gln Ser Asp Phe Ala Val		
340	345	350
Arg Gln Tyr Val Leu Asp Cys Val Asp Lys Ala Lys Asp Val Ala Ala		
355	360	365
Ala Gln Arg Val Ala Asn Glu Val Leu Ala Ser Leu Gly Val Asp Ser		
370	375	380
Thr Pro Cys Met Ile Val Met Asp Asp Val Asp Leu Asp Ala Val Leu		
385	390	395
Pro Thr His Gly Asp Ala Thr Lys Arg Asp Leu Asn Ala Ala Val Phe		
405	410	415
Ala Gly Asn Glu Gln Thr Ile Leu Arg Thr His		
420	425	

【0063】

<210> 7

<211> 4447

<212> DNA

<213> Brevibacterium lactofermentum

<220>

<221> CDS

<222> (1318)..(2598)

<400> 7

aagcttgtct acgtctgatg ctttgaatcg gacggacttg ccgatcttgt atgcggtgat 60
ttttccctcg ttgcccact ttttaatggg ggccgggggtg agagctacgc gggcggcgac 120
ctgctgcgct gtgatccaat attcggggtc gttcactggg tcccccttct gatttctggc 180
atagaagaac ccccgatgaac tgtgtgggtc cgggggttgc tgatttttgc gagacttctc 240
gcgcaattcc ctagcttagg tgaaaacacc atgaaacact agggaaacac ccatgaaaca 300
cccattaggg cagtagggcg gcttcttcgt ctagggcttg catttgggcg gtgatctggg 360
ctttagcgtg tgaaagtgtg tcgtaggtgg cgtgctcaat gcactcgaac gtcacgtcat 420
ttaccgggtc acggtgggca aagagaacta gtgggttaga cattgttttc ctggttgcg 480
gtgggtgga gcttttctag ccgctcgga aacgcggcga tcatgaactc ttggagggtt 540
tcaccgttct gcatgcctgc gcgcttcag tcctcacgta gtgccaaagg aacgcgtgcg 600
gtgaccacga cgggcttagc cttgcctgc gcttctagtg cttcgatggg ggcttgtgcc 660
tgcgcttgct gcgcctgtag tgcctgttga gcttcttgta gttgctgttc tagctgtgcc 720
ttggttgcca tgctttaaga ctctagtagc tttcctgcga tatgtcatgc gcatgcgtag 780
caaacattgt cctgcaactc attcattatg tgcagtgtc ctgttactag tcgtacatac 840
tcatatttac ctagtctgca tgcagtgcag gcacatgcag tcatgtcgtg ctaatgtgta 900
aaacatgtac atgcagattg ctgggggtgc agggggcgga gccaccctgt ccatgcgggg 960
tgtggggctt gccccgccg tacagacagt gagcaccggg gcacctagtc gcggataccc 1020
cccctaggta tcggacacgt aaccctccca tgcgatgca aatctttaac attgagtacg 1080
ggtaagctgg cacgcatagc caagctaggc ggccaccaa caccactaaa aattaatagt 1140
tcctagacaa gacaaacccc cgtgcgagct accaactcat atgcacgggg gccacataac 1200
ccgaaggggt ttcaattgac aaccatagca ctagctaaga caacgggcac aacatccgca 1260
caaactcgca ctgcgcaacc ccgcacaaca tcgggtctag gtaacactga aatagaa 1317
gtg aac acc tct aag gaa ccg cag gtc aat gag ggt tct aag gtc act 1365
Val Asn Thr Ser Lys Glu Pro Gln Val Asn Glu Gly Ser Lys Val Thr
1 5 10 15
cgc gct agg gcg tgg cgt agg caa aac gtc atg tac aag atc acc aat 1413
Arg Ala Arg Ala Trp Arg Arg Gln Asn Val Met Tyr Lys Ile Thr Asn

20

25

30

agt aag gct ctg gcg ggg tgc cat agg tgg cgc agg gac gaa gct gtt 1461
 Ser Lys Ala Leu Ala Gly Cys His Arg Trp Arg Arg Asp Glu Ala Val
 35 40 45
 gcg gtg tcc tgg tcg tct aac ggt gct tcg cag ttt gag ggt ctg caa 1509
 Ala Val Ser Trp Ser Ser Asn Gly Ala Ser Gln Phe Glu Gly Leu Gln
 50 55 60
 aac tct cac tct cgc tgg ggg tca tct ctg gct gaa ttg gaa gtc atg 1557
 Asn Ser His Ser Arg Trp Gly Ser Ser Leu Ala Glu Leu Glu Val Met
 65 70 75 80
 ggc gaa cgc cgc att gag ctg gct att gct act aag aat cac ttg gcg 1605
 Gly Glu Arg Arg Ile Glu Leu Ala Ile Ala Thr Lys Asn His Leu Ala
 85 90 95
 gcg ggt ggc gcg ctc atg atg ttt gtg ggc act gtt cga cac aac cgc 1653
 Ala Gly Gly Ala Leu Met Met Phe Val Gly Thr Val Arg His Asn Arg
 100 105 110
 tca cag tca ttt gcg cag gtt gaa gcg ggt att aag act gcg tac tct 1701
 Ser Gln Ser Phe Ala Gln Val Glu Ala Gly Ile Lys Thr Ala Tyr Ser
 115 120 125
 tcg atg gtg aaa aca tct cag tgg aag aaa gaa cgt gca cgg tac ggg 1749
 Ser Met Val Lys Thr Ser Gln Trp Lys Lys Glu Arg Ala Arg Tyr Gly
 130 135 140
 gtg gag cac acc tat agt gac tat gag gtc aca gac tct tgg gcg aac 1797
 Val Glu His Thr Tyr Ser Asp Tyr Glu Val Thr Asp Ser Trp Ala Asn
 145 150 155 160
 ggt tgg cac ttg cac cgc aac atg ctg ttg ttc ttg gat cgt cca ctg 1845
 Gly Trp His Leu His Arg Asn Met Leu Leu Phe Leu Asp Arg Pro Leu
 165 170 175
 tct gac gat gaa ctc aag gca ttt gag gat tcc atg ttt tcc cgc tgg 1893
 Ser Asp Asp Glu Leu Lys Ala Phe Glu Asp Ser Met Phe Ser Arg Trp

180	185	190	
tct gct ggt gtg gtt aag gcc ggt atg gac gcg cca ctg cgt gag cac			1941
Ser Ala Gly Val Val Lys Ala Gly Met Asp Ala Pro Leu Arg Glu His			
195	200	205	
ggg gtc aaa ctt gat cag gtg tct acc tgg ggt gga gac gct gcg aaa			1989
Gly Val Lys Leu Asp Gln Val Ser Thr Trp Gly Gly Asp Ala Ala Lys			
210	215	220	
atg gca acc tac ctc gct aag ggc atg tct cag gaa ctg act ggc tcc			2037
Met Ala Thr Tyr Leu Ala Lys Gly Met Ser Gln Glu Leu Thr Gly Ser			
225	230	235	240
gct act aaa acc gcg tct aaa ggg tcg tac acg ccg ttt cag atg ttg			2085
Ala Thr Lys Thr Ala Ser Lys Gly Ser Tyr Thr Pro Phe Gln Met Leu			
245	250	255	
gat atg ttg gcc gat caa agc gac gcc ggc gag gat atg gac gct gtt			2133
Asp Met Leu Ala Asp Gln Ser Asp Ala Gly Glu Asp Met Asp Ala Val			
260	265	270	
ttg gtg gct cgg tgg cgt gag tat gag gtt ggt tct aaa aac ctg cgt			2181
Leu Val Ala Arg Trp Arg Glu Tyr Glu Val Gly Ser Lys Asn Leu Arg			
275	280	285	
tcg tct tgg tca cgt ggg gct aag cgt gct ttg ggc att gat tac ata			2229
Ser Ser Trp Ser Arg Gly Ala Lys Arg Ala Leu Gly Ile Asp Tyr Ile			
290	295	300	
gac gct gat gta cgt cgt gaa atg gaa gaa gaa ctg tac aag ctc gcc			2277
Asp Ala Asp Val Arg Arg Glu Met Glu Glu Glu Leu Tyr Lys Leu Ala			
305	310	315	320
ggt ctg gaa gca ccg gaa cgg gtc gaa tca acc cgc gtt gct gtt gct			2325
Gly Leu Glu Ala Pro Glu Arg Val Glu Ser Thr Arg Val Ala Val Ala			
325	330	335	
ttg gtg aag ccc gat gat tgg aaa ctg att cag tct gat ttc gcg gtt			2373

Leu Val Lys Pro Asp Asp Trp Lys Leu Ile Gln Ser Asp Phe Ala Val
 340 345 350
 agg cag tac gtt cta gat tgc gtg gat aag gct aag gac gtg gcc gct 2421
 Arg Gln Tyr Val Leu Asp Cys Val Asp Lys Ala Lys Asp Val Ala Ala
 355 360 365
 gcg caa cgt gtc gct aat gag gtg ctg gca agt ctg ggt gtg gat tcc 2469
 Ala Gln Arg Val Ala Asn Glu Val Leu Ala Ser Leu Gly Val Asp Ser
 370 375 380
 acc ccg tgc atg atc gtt atg gat gat gtg gac ttg gac gcg gtt ctg 2517
 Thr Pro Cys Met Ile Val Met Asp Asp Val Asp Leu Asp Ala Val Leu
 385 390 395 400
 cct act cat ggg gac gct act aag cgt gat ctg aat gcg gcg gtg ttc 2565
 Pro Thr His Gly Asp Ala Thr Lys Arg Asp Leu Asn Ala Ala Val Phe
 405 410 415
 gcg ggt aat gag cag act att ctt cgc acc cac taaaagcggc ataaaccccg 2618
 Ala Gly Asn Glu Gln Thr Ile Leu Arg Thr His
 420 425
 ttcgatattt tgtgcgatga atttatggtc aatgtcgcgg gggcaaacta tgatgggtct 2678
 tgttggtgac aatggctgat ttcacagga atggaactgt catgctgtta tgtgcctggc 2738
 tcctaataca agctggggac aatgggttgc cccgttgatc tgatctagtt cggattggcg 2798
 gggcttcact gtatctgggg gtggcatcgt gaatagattg cacaccgtag tgggcagtgt 2858
 gcacaccata gtgggcatga gtaataccta cgcgcgcgtg ggctagggct taacgcgcgt 2918
 ttgcccgtgc tgcggggcat acgttagcgc atacgctttt ttctgtgaaa cctttttgtg 2978
 ttgttgtttc gtgttggttt cttttctgtt ggcggggcaa cttaacgcct gcgggggtgg 3038
 ttgttgacgt taacgggggt agtttttatt cccctagtgg tttttcagta cgacaatcga 3098
 gaaagacctg tttagccag ttcgggtcat gttcgtcgtt atggccacgt gcatagcgac 3158
 cagttttcga gttcactggg atttttggtg catcaaaca gatgtaggac aatgcggttt 3218
 ctaggtctac tttttgcttt atgccgtaca agccccgtgg gtattcagcg attgattcca 3278
 aggcggcttc ccagtcctgt tttgtgaagg actggcttag ttctaggtct gtgtctgggt 3338

agtactgcctt gtttgtgttaa gcgccgttgg tgctcattga tgattccttt gaagtgtttg 3398
 gagttcggct agtagtgccg cgtatgggtgc tgctttttgc tcgtgatagc tcgccttggc 3458
 tatgaggtcg gctaggtagg ttccgggggt gcctaggttg cgtaggtcta gcaaattcccg 3518
 gtatgtggcc tgtgcgctgc gctgggtggg catacagtcg ttaagctggg cttttacgtc 3578
 tgcgatgcgg tggcggttag gcatgttggg gtgcttcttc caagtactca cgggcgggtt 3638
 ttgtgtatgc ctggcgtgat gcttctttga gctgttggag ttccgcttgg agtgcgggta 3698
 gttcgtccgc gaactgcttg tggctactcg atttctcttg ttccctgggcg atagcatttg 3758
 cgttgaattg cagggcggtg agttcgtcca cgcgtcgttt tgctgcgttg gtcattggtg 3818
 cgtgccattt gcggttgttg acgcgggggt caaggttgcg cacggctgct tcggctaggt 3878
 tgggtggctgc ttttttcagt gctcgggctt cccgttcttc gtccaacgag agcaccttg 3938
 gtttgttggc ttccgctagt ttttgcctct ccgctttgat gagttggtca acttcgtgtt 3998
 gggagaggctc gtttttcacg atgcgtcgaa tgtggctggt gtgggtgctg agttggtgtg 4058
 agaggtagtg gggttctggg atttcggcga gttggctgag gttggtgtag tgcgggttgc 4118
 ggcctgggtg gttgggttcg ctggggagggt cgatgtatcc ggttgagtct ccggcgtggt 4178
 tgaagtgaat taggcgttgg tagccgtatt cctggttggg gaggtacgac agaattgagga 4238
 agtttgggtgc ttctctgca atgagtcgtg cgtgttcgta gttcgggtact gggctcgtgct 4298
 cggggagaaat gttcttttgg gtcattggctt ctctttctgt tgctctgtaa gtccgtatgt 4358
 gggcatggga aagccccggc aacccttttg gtcaaccggg gctagatagt cgcttagaat 4418
 ggcttctagg ctgcgtctcg ggggtgtggc 4447

[0064]

<210> 8

<211> 427

<212> PRT

<213> Brevibacterium lactofermentum

<400> 8

Val Asn Thr Ser Lys Glu Pro Gln Val Asn Glu Gly Ser Lys Val Thr

1

5

10

15

Arg Ala Arg Ala Trp Arg Arg Gln Asn Val Met Tyr Lys Ile Thr Asn

20	25	30
Ser Lys Ala Leu Ala Gly Cys His Arg Trp Arg Arg Asp Glu Ala Val		
35	40	45
Ala Val Ser Trp Ser Ser Asn Gly Ala Ser Gln Phe Glu Gly Leu Gln		
50	55	60
Asn Ser His Ser Arg Trp Gly Ser Ser Leu Ala Glu Leu Glu Val Met		
65	70	75
Gly Glu Arg Arg Ile Glu Leu Ala Ile Ala Thr Lys Asn His Leu Ala		
85	90	95
Ala Gly Gly Ala Leu Met Met Phe Val Gly Thr Val Arg His Asn Arg		
100	105	110
Ser Gln Ser Phe Ala Gln Val Glu Ala Gly Ile Lys Thr Ala Tyr Ser		
115	120	125
Ser Met Val Lys Thr Ser Gln Trp Lys Lys Glu Arg Ala Arg Tyr Gly		
130	135	140
Val Glu His Thr Tyr Ser Asp Tyr Glu Val Thr Asp Ser Trp Ala Asn		
145	150	155
Gly Trp His Leu His Arg Asn Met Leu Leu Phe Leu Asp Arg Pro Leu		
165	170	175
Ser Asp Asp Glu Leu Lys Ala Phe Glu Asp Ser Met Phe Ser Arg Trp		
180	185	190
Ser Ala Gly Val Val Lys Ala Gly Met Asp Ala Pro Leu Arg Glu His		
195	200	205
Gly Val Lys Leu Asp Gln Val Ser Thr Trp Gly Gly Asp Ala Ala Lys		
210	215	220
Met Ala Thr Tyr Leu Ala Lys Gly Met Ser Gln Glu Leu Thr Gly Ser		
225	230	235
Ala Thr Lys Thr Ala Ser Lys Gly Ser Tyr Thr Pro Phe Gln Met Leu		
245	250	255

Asp Met Leu Ala Asp Gln Ser Asp Ala Gly Glu Asp Met Asp Ala Val			
260	265	270	
Leu Val Ala Arg Trp Arg Glu Tyr Glu Val Gly Ser Lys Asn Leu Arg			
275	280	285	
Ser Ser Trp Ser Arg Gly Ala Lys Arg Ala Leu Gly Ile Asp Tyr Ile			
290	295	300	
Asp Ala Asp Val Arg Arg Glu Met Glu Glu Glu Leu Tyr Lys Leu Ala			
305	310	315	320
Gly Leu Glu Ala Pro Glu Arg Val Glu Ser Thr Arg Val Ala Val Ala			
325	330	335	
Leu Val Lys Pro Asp Asp Trp Lys Leu Ile Gln Ser Asp Phe Ala Val			
340	345	350	
Arg Gln Tyr Val Leu Asp Cys Val Asp Lys Ala Lys Asp Val Ala Ala			
355	360	365	
Ala Gln Arg Val Ala Asn Glu Val Leu Ala Ser Leu Gly Val Asp Ser			
370	375	380	
Thr Pro Cys Met Ile Val Met Asp Asp Val Asp Leu Asp Ala Val Leu			
385	390	395	400
Pro Thr His Gly Asp Ala Thr Lys Arg Asp Leu Asn Ala Ala Val Phe			
405	410	415	
Ala Gly Asn Glu Gln Thr Ile Leu Arg Thr His			
420	425		

【 0 0 6 5 】

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
introducing mutation to pAM330

<400> 9

aaacccgggc tacgtctgat gctttgaatc

30

【 0 0 6 6 】

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
introducing mutation to pAM330

<400> 10

ttggtgcatc aaacaagatg tag

23

【 0 0 6 7 】

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
introducing mutation to pAM330

<400> 11

ttttcccgagg agcttgccac accccgag

28

【 0 0 6 8 】

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
introducing mutation to pAM330

<400> 12

tgtcctacat cttgtttgat gcaccaa

27

【 0 0 6 9 】

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
introducing mutation to pAM330

<400> 13

gaggttttca ccgttctgca tgcc

24

【 0 0 7 0 】

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
introducing mutation to pAM330

<400> 14

aactcaccgc cctgcaattc aac

23

【 0 0 7 1 】

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for PCR

<400> 15

gcctaccgcg gcaaagaagt ggcag

25

【 0 0 7 2 】

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for PCR

<400> 16

gccttgaact aggggcgctt taagt

25

【 0 0 7 3 】

<210> 17

<211> 4235

<212> DNA

<213> *Brevibacterium flavum*

<220>

<221> CDS

<222> (1852)..(2364)

<400> 17

```

aaacccgggt tttcttctgc aactcgggcg ccgaagcaaa cgaggctgct ttcaagattg 60
cacgcttgac tggtcgttcc cggattctgg ctgcagtcca tggtttccac ggccgcacca 120
tgggttcctt cgcgctgact ggccagccag acaagcgtga agcgttcctg ccaatgccaa 180
gcggtgtgga gttctaccct tacggcgaca ccgattactt gcgcaaaatg gtagaaacca 240
acccaacgga tgtggctgct atcttcctcg agccaatcca gggtgaaacg ggcgttggtc 300
cagcacctga aggattcctc aaggcagtcg gcgagctgtg cgatgagtac ggcattctga 360
tgatcaccga tgaagtccag actggcgttg gccgtaccgg cgatttcttt gcacatcagc 420
acgatggcgt tgttcccgat gtggtgacca tggccaaggg acttggcggc ggtcttccca 480
tcggtgcttg tttggccact ggccgtgcag ctgaattgat gaccccaggc aagcacggca 540
ccactttcgg tggcaaccca gttgcttgtg cagctgccaa ggcagtgtg tctgttgtcg 600
atgacgcttt ctgcgcagaa gttaccgcga agggcgagct gttcaaggta cttcttgcca 660
aggttgacgg cgttgtagac gtccgtggca ggggcttgat gttgggcgtg gtgctggagc 720
gcgacgtcgc aaagcaagct gttcttgatg gttttaagca cggcgttatt ttgaatgcac 780
cggcggacaa cattatccgt ttgacccgcg cgctgggtgat caccgacgaa gaaatcgagc 840
acgcagtcaa ggctattgcc gagacaatcg cataaaggac ttaaacttat gacttcacaa 900
ccacaggttc gccatttcct ggctgatgat gatctcacc ctgcagagca ggcagaggtt 960
ttgaccctag ccgcaaagct caaggcagcg ccgttttcgg agcgtccact cgagggacca 1020
aagtccgttg cagttctttt tgataagact tcaactcgta ctcgcttctc cttcgacgcg 1080

```

ggcatcgctc atttgggtgg acatgccatc gtcgtggatt ccggcagctc acagatgggt 1140
 aagggcgaga ccctgcagga caccgcagct gtattgtccc gctacgtgga agcaattgtg 1200
 tggcgcacct acgcacacag caatttccac gccatggcgg agacgtccac tgtgccgctg 1260
 gtgaactcct tgtccgatga tctgcaccca tgccagattc tggctgatct gcagaccatc 1320
 gtggaaaacc tcagccctga agaaggccca gcaggcctta agggtaagaa ggctgtgtac 1380
 ctgggcgatg gcgacaacaa catggccaac tcctacatga ttggctttgc caccgcgggc 1440
 atggatatat ccatcatcgc tcctgaaggg ttccagcctc gtgcggaatt cgtggagcgc 1500
 gcggaaaagc gtggccagga aaccggcgcg aaggttgttg tcaccgacag cctcgacgag 1560
 gttgccggcg ccgatgttgt catcaccgat acctgggtat ccatgggtat ggaaaacgac 1620
 ggcatcgatc gcaccacacc ttctgttctt taccaggica acgatgaggt catggcgaaa 1680
 gctaacgacg gcgccatctt cctgcactgc cttcctgcct accgcggcaa agaagtggca 1740
 gccctcgtga ttgatggacc agcgtccaaa gttttcgatg aagcagaaaa ccgcctccac 1800
 gctcagaaaag cactgctggt gtggctgctg gccaaccagc cgaggtaaga c atg tct 1857

Met Ser

1

ctt ggc tca acc ccg tca aca ccg gaa aac tta aat ccc gtg act cgc 1905
 Leu Gly Ser Thr Pro Ser Thr Pro Glu Asn Leu Asn Pro Val Thr Arg
 5 10 15
 act gca cgc caa gct ctc att ttg cag att ttg gac aaa caa aaa gtc 1953
 Thr Ala Arg Gln Ala Leu Ile Leu Gln Ile Leu Asp Lys Gln Lys Val
 20 25 30
 acc agc cag gta caa ctg tct gaa ttg ctg ctg gat gaa ggc atc gat 2001
 Thr Ser Gln Val Gln Leu Ser Glu Leu Leu Leu Asp Glu Gly Ile Asp
 35 40 45 50
 atc acc cag gcc acc ttg tcc cgg gat ctc gat gaa ctc ggt gca cgc 2049
 Ile Thr Gln Ala Thr Leu Ser Arg Asp Leu Asp Glu Leu Gly Ala Arg
 55 60 65
 aag gtt cgc ccc gat ggg gga cgc gcc tac tac gcg gtc ggc cca gta 2097
 Lys Val Arg Pro Asp Gly Gly Arg Ala Tyr Tyr Ala Val Gly Pro Val

70	75	80	
gat agc atc gcc cgc gaa gat ctc cgg ggt ccg tcg gag aag ctg cgc			2145
Asp Ser Ile Ala Arg Glu Asp Leu Arg Gly Pro Ser Glu Lys Leu Arg			
85	90	95	
cgc atg ctt gat gaa ctg ctg gtt tct aca gat cat tcc ggc aac atc			2193
Arg Met Leu Asp Glu Leu Leu Val Ser Thr Asp His Ser Gly Asn Ile			
100	105	110	
gcg atg ctg cgc acc ccg ccg gga gct gcc cag tac ctg gca agt ttc			2241
Ala Met Leu Arg Thr Pro Pro Gly Ala Ala Gln Tyr Leu Ala Ser Phe			
115	120	125	130
atc gat agg gtg ggg ctg aaa gaa gtc gtt ggc acc atc gct ggc gat			2289
Ile Asp Arg Val Gly Leu Lys Glu Val Val Gly Thr Ile Ala Gly Asp			
135	140	145	
gac acc gtt ttt gtt ctc gcc cgt gat ccg ctc aca ggt aaa gaa cta			2337
Asp Thr Val Phe Val Leu Ala Arg Asp Pro Leu Thr Gly Lys Glu Leu			
150	155	160	
ggt gaa tta ctc agc ggg cgc acc act taaagcgccc ctagttcaag			2384
Gly Glu Leu Leu Ser Gly Arg Thr Thr			
165	170		
gcttgtaa cgttgtaa tgcaggcagg taaggataa cccgagtgtt ttttcgagga 2444			
ataccaacc tttcaaca ataattttct ttaaaccatcc ttgctgtcca ccacggctgg 2504			
caaggaactt aaaatgaagg agcacacctc atgactaacc gcatcgttct tgcatactcc 2564			
ggcggctctgg acaccactgt ggcaattcca tacctgaaga agatgattga tggatgaagtc 2624			
atcgagttt ctctcgacct gggccagggt ggagagaaca tggacaacgt tcgccagcgt 2684			
gcattggatg ccggtgcagc tgagtccatc gttgttgatg caaaggatga gttcgtgag 2744			
gagtactgcc tgccaaccat caaggcaaac ggcatgtaca tgaagcagta cccactgggt 2804			
tctgcaatct cccgccact gatcgtcaag cacctcgttg aggctggcaa gcagttcaac 2864			
ggtaccacg ttgcacacgg ctgcactggt aagggaacg accaggttcg tttcgaggtc 2924			
ggcttcatgg acaccgatcc aaacctggag atcattgcac ctgctcgtga cttcgcattg 2984			

acccgcgaca aggctatcgc cttcgccgag gagaacaacg ttccaatcga gcagtccgtg 3044
 aagtcccat tctccatcga ccagaacgtc tggggccgcg ctattgagac cggttacctg 3104
 gaagatctgt ggaatgctcc aaccaaggac atctacgcat acaccgagga tccagctctg 3164
 ggtaacgctc cagatgaggt catcatctcc ttcgagggtg gcaagccagt ctccatcgat 3224
 ggccgtccag tctccgtact gcaggctatt gaagagctga accgtcgtgc aggcgcacag 3284
 ggCgttgcc gccttgacat ggttgaggac cgtctcgtgg gcatcaagtc ccgcgaaatc 3344
 tacgaagcac caggcgcaat cgcactgatt aaggctcacg aggctttgga agatgtcacc 3404
 atcgagcgcg aactggctcg ctacaagcgt ggCgttgacg cacgttgggc tgaggaagta 3464
 tacgacggcc tgtggttcgg acctctgaag cgctccctgg acgcgttcat tgattccacc 3524
 caggagcacg tcaccggcga tatccgatg gttctgcacg caggttccat caccatcaat 3584
 ggtcgtcgtt ccagccactc cctgtacgac ttcaacctgg ctacctacga caccggcgac 3644
 accttcgacc agaccctggc taagggtttt gtccagctgc acggtctgtc ctccaagatc 3704
 gctaacaagc gcgatcgca agctggcaac aactaagcca cttttcaag catccagact 3764
 agaacttcaa gtatttagaa agtagaagaa caccacatgg aacagcacgg aaccaatgaa 3824
 ggtgcgctgt ggggcggccg cttctccggt ggacctccg aggccatgtt cgccttgagt 3884
 gtctccactc atttcgactg ggttttgcc cttatgatg tgttggcctc caaggcacac 3944
 gccaaggttt tgcaccaagc agagctactt tctgatgaag atctagccac catgctggct 4004
 ggtcttgatc agctgggcaa ggatgtcgcc gacggaacct tcggtccgct gccttctgat 4064
 gaggatgtgc acggcgcgat ggaacgcggt ctgattgacc gcgttgggtc tgagggtggc 4124
 ggccgtctgc gcgctggctg tccccgaac gaccaggtgg caaccctgtt ccgcatgtgg 4184
 gtccgcgacg cagtgcgca catcgcgctg ggaacaaccg agcttgtcga c 4235

【 0 0 7 4 】

<210> 18

<211> 171

<212> PRT

<213> *Brevibacterium flavum*

<400> 18

Met Ser Leu Gly Ser Thr Pro Ser Thr Pro Glu Asn Leu Asn Pro Val

1	5	10	15
Thr Arg Thr Ala Arg Gln Ala Leu Ile Leu Gln Ile Leu Asp Lys Gln			
20	25	30	
Lys Val Thr Ser Gln Val Gln Leu Ser Glu Leu Leu Leu Asp Glu Gly			
35	40	45	
Ile Asp Ile Thr Gln Ala Thr Leu Ser Arg Asp Leu Asp Glu Leu Gly			
50	55	60	
Ala Arg Lys Val Arg Pro Asp Gly Gly Arg Ala Tyr Tyr Ala Val Gly			
65	70	75	80
Pro Val Asp Ser Ile Ala Arg Glu Asp Leu Arg Gly Pro Ser Glu Lys			
85	90	95	
Leu Arg Arg Met Leu Asp Glu Leu Leu Val Ser Thr Asp His Ser Gly			
100	105	110	
Asn Ile Ala Met Leu Arg Thr Pro Pro Gly Ala Ala Gln Tyr Leu Ala			
115	120	125	
Ser Phe Ile Asp Arg Val Gly Leu Lys Glu Val Val Gly Thr Ile Ala			
130	135	140	
Gly Asp Asp Thr Val Phe Val Leu Ala Arg Asp Pro Leu Thr Gly Lys			
145	150	155	160
Glu Leu Gly Glu Leu Leu Ser Gly Arg Thr Thr			
165	170		

【 0 0 7 5 】

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for PCR

<400> 19

cccgggtttt cttctgcaac tcggg

25

【 0 0 7 6 】

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for PCR

<400> 20

gtcgacaagc tcggttggtc ccagc

25

【 0 0 7 7 】

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for PCR

<400> 21

cccctagttc aaggcttggt aatc

24

【 0 0 7 8 】

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for PCR

<400> 22

gtcttacctc ggctggttgg ccagc

25

【図面の簡単な説明】

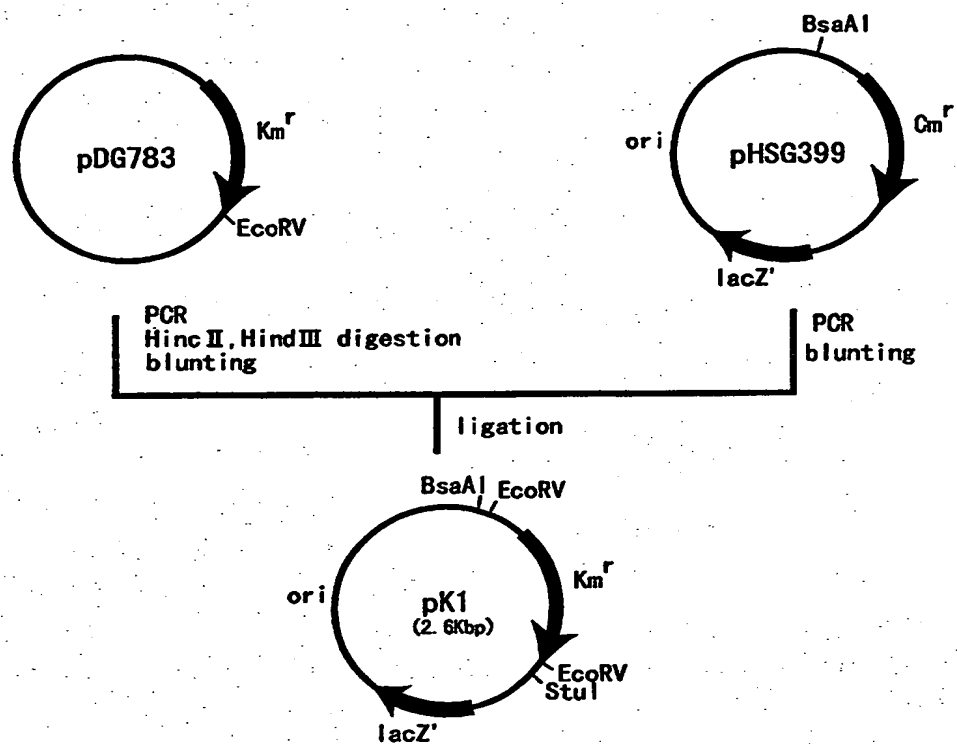
【図 1】 プラスミド pK1 の構築過程を示す図。

【図 2】 プラスミド pSFK6 の構築過程を示す図。

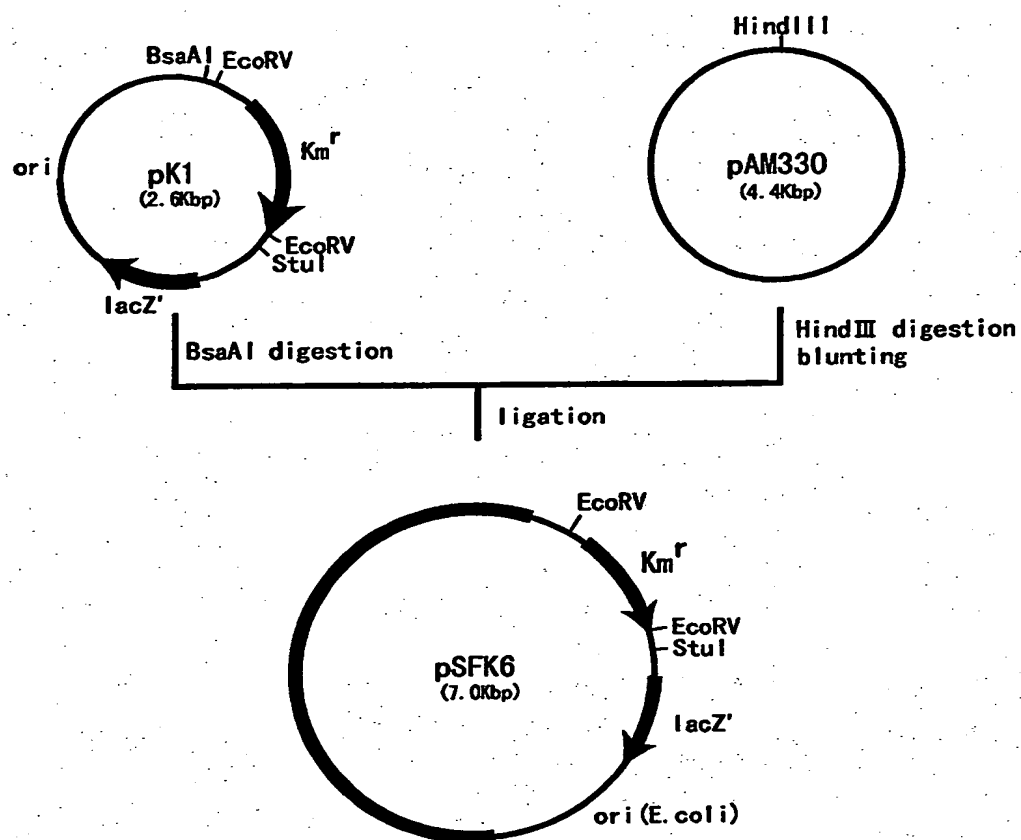
【図 3】 プラスミド pSFKT1 の構築過程を示す図。

【書類名】 図面

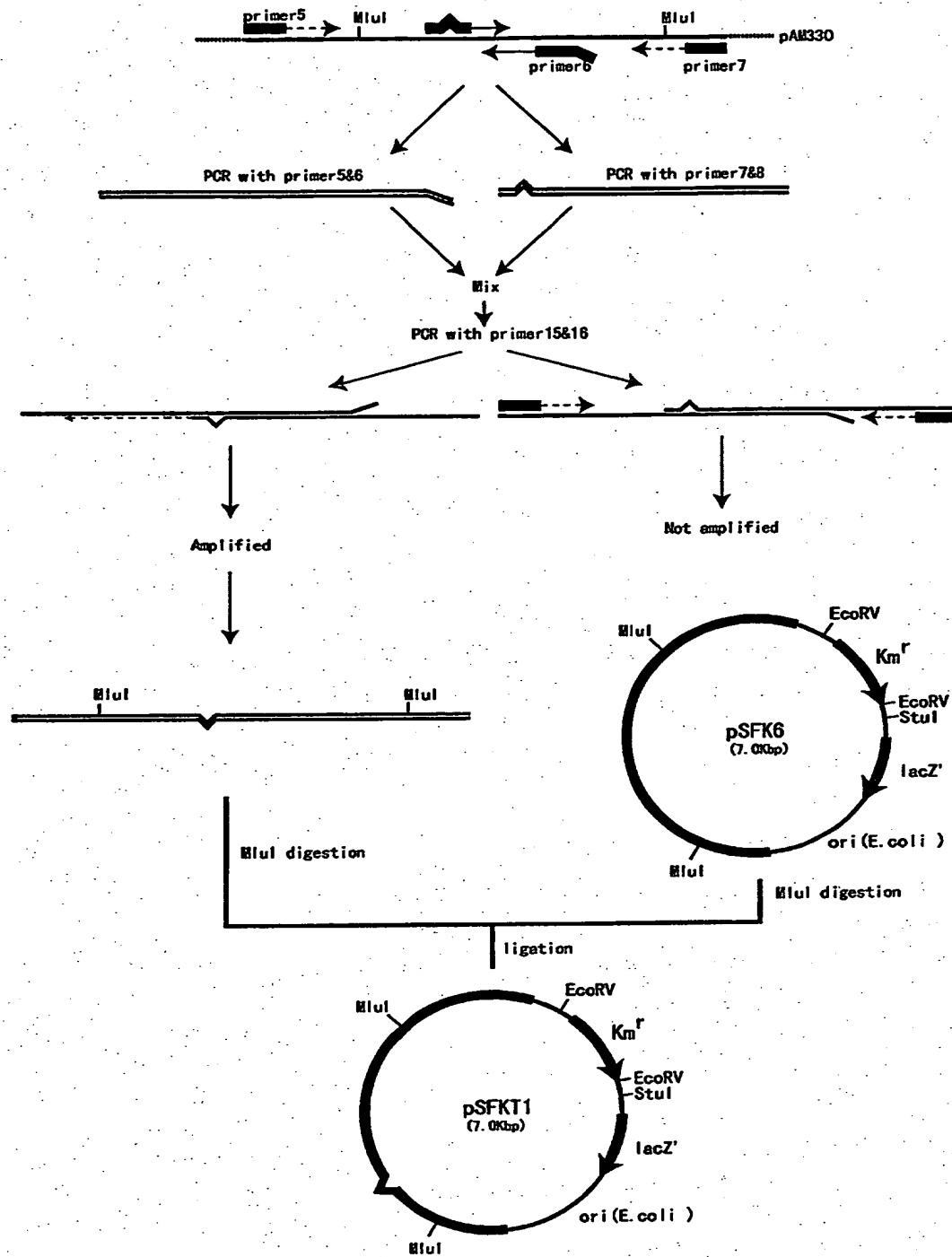
【図 1】



【図 2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 コリネ型細菌のＬ－アルギニン生合成のリプレッサーを特定し、コリネ型細菌のＬ－アルギニン生産能を向上させること。

【解決手段】 Ｌ－アルギニン生合成のリプレッサーを、同リプレッサーをコードする遺伝子を破壊することにより欠失し、かつ、Ｌ－アルギニン生産能を有するコリネ型細菌を培地で培養し、培地中にＬ－アルギニンを生成蓄積せしめ、これを該培地から採取することにより、Ｌ－アルギニンを製造する。

【選択図】 図 2

特 2 0 0 0 - 1 2 9 1 6 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 0 0 6 6]

1. 変更年月日 1 9 9 1 年 7 月 2 日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都中央区京橋 1 丁目 1 5 番 1 号

氏 名 味の素株式会社